

# 组方提取物 A 的抗光化功效及其机理研究

高擎<sup>1</sup>, 金鑫<sup>1</sup>, 葛亚中<sup>1</sup>, 季德胜<sup>2</sup>, 游丽君<sup>2</sup>

(1. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510665)

(2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 长期紫外线照射会引发诸多皮肤相关疾病, 皮肤的保养越来越受到学者们的广泛关注。本研究组方提取物 A 对大鼠抗光老化的影响。通过病理学分析和电镜检测照射部位皮肤组织病理学形态及超微结构; 采用免疫组化和荧光定量 PCR 检测皮肤基质金属蛋白酶 1 (MMP-1)、MMP-2、MMP-9 和 Ia 抗原的表达以及皮肤组织中 I 型胶原、III 型胶原、结缔组织生长因子 (CTGF)、转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 基因表达情况。研究表明: 与模型对照组相比, 组方提取物 A 低、中、高剂量组照射部位皮肤真皮间质血管扩张、炎细胞浸润、成纤维细胞增生减轻, 真皮弹力纤维变性、局灶性蓄积减轻, 皮肤表皮厚度、真皮层成纤维细胞数显著降低, 照射部位皮肤的超微结构得到改善, 提取物 A 可降低皮肤转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 的表达, 提高皮肤 III 型胶原的表达。因此, 组方提取物 A 具有较好的抗光老化功效。

**关键词:** 基质金属蛋白酶; 紫外线; 皮肤; 光老化; 大鼠

文章篇号: 1673-9078(2016)9-100-106

DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.015

## Anti-photoaging Activity of Extract A from a Traditional Chinese Medicine Formula and its Mechanism of Action

GAO Qing<sup>1</sup>, JIN Xin<sup>1</sup>, GE Ya-zhong<sup>1</sup>, JI De-sheng<sup>2</sup>, YOU Li-jun<sup>2</sup>

(1. Infitinus (China) Co. Ltd., Guangzhou 510665, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Because ultraviolet light (UV) can cause various skin diseases, scientists have been paying increasing attention to the study of skin care. The anti-photoaging effect of an extract A from a traditional Chinese medicine formula was studied on UV-irradiated rats. The morphology and ultrastructure of the skin tissues were determined by pathological analysis and electron microscopy, respectively. Immunohistochemical analysis and the fluorogenic quantitative polymerase chain reaction were used to determine the skin tissue matrix metalloproteinase 1 (MMP-1), MMP-2, MMP-9, and Ia antigen expression levels, as well as the gene expression levels of skin collagen type I and collagen type III, and connective tissue growth factor and transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ). Compared with the model control group, rats in the low-, medium- and high-dose extract-A-treated groups showed mitigated dermal interstitial vasodilation, inflammatory cell infiltration, fibroblast hyperplasia, dermal elastic fiber degeneration, and focal accumulation, with decreases in skin thickness of the epidermis and the number of dermal fibroblasts of the irradiated skin. Extract A also improved the ultrastructure of the irradiated skin, and reduced the expression of TGF- $\beta_1$  while improving that of collagen type III. Therefore, extract A of this traditional Chinese medicine formula possesses strong anti-photoaging activity.

**Key words:** matrix metalloproteinase; ultraviolet; skin; photoaging; rat

人体皮肤每天都接受日光中紫外线的辐照, 而紫外线(Ultraviolet, UV)是导致皮肤老化的最重要的外源性因素, 由 UV 引起的皮肤老化称之为皮肤光老化(Photoaging)<sup>[1,2]</sup>。长期紫外线照射能够导致严重的皮肤等问题<sup>[3]</sup>。皮肤光老化主要表现在真皮基质的改变,

收稿日期: 2015-09-05

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2014A030313242); 中央高校科研业务费项目(2015ZZ110); 广东省科技计划项目(2013B090700008)

作者简介: 高擎(1986-), 硕士, 研究方向: 食品科学

其中 MMP、结缔组织生长因子(CTGF)和转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 等参与其中, 起着至关重要的作用<sup>[4]</sup>。人类皮肤中胶原大约占了 90%的蛋白, 提供了强度、弹性。人类真皮中 I 型胶原占 85%, III型占 10%<sup>[5]</sup>。TGF- $\beta_1$  及 AP-1 是胶原蛋白的两个重要调节器。TGF- $\beta$  是多功能细胞因子, 可促进形成 I 型和 III 型胶原<sup>[6]</sup>。近年来研究表明, 紫外线照射可影响基质金属蛋白酶的表达。MMP 是一个锌依赖性的酶家族, 能够特异性地降解结缔组织中的蛋白质, 如 MMP-1 可降解 I、

III、VII 和 X 型胶原; MMP-2 可降解 IV、V 型胶原、变性胶原和弹性蛋白; MMP-3 能降解 III、IV、V、X 型胶原、蛋白多糖、纤黏连蛋白和变性胶原等。紫外线照射人体皮肤可诱导这 3 种 MMP 表达。此外, MMP 酶家族的表达也受多种炎性细胞因子如白介素-1、 $\gamma$ -干扰素和肿瘤坏死因子的诱导<sup>[7]</sup>。调节光老化皮肤真皮细胞外基质改变除了 MMP 活性升高外, 还与天然拮抗剂 TIMP-1 活性不足有关<sup>[8]</sup>。但目前关于皮肤光老化机制尚不明确, 治疗手段与方法亦不成熟, 因而需要深入探讨其发病的分子机制, 为延缓皮肤光老化功能食品的研发提供理论依据。

本研究在前人的基础上, 进一步研究了皮肤光老化过程中结缔组织生长因子(CTGF)、转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )的基因表达情况。采用紫外线照射诱导皮肤光老化损伤建立大鼠皮肤光老化模型, 通过病理学分析照射部位皮肤组织病理学形态差异以及皮肤的超微结构; 采用免疫组化和荧光定量 PCR 检测照射部位皮肤基质金属蛋白酶 1(MMP-1)、MMP-2、MMP-9、Ia 抗原的表达以及皮肤组织中 I 型胶原、III 型胶原、结缔组织生长因子(CTGF)、转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )基因表达情况, 以探讨组方提取物 A 对大鼠皮肤抗光老化的影响。本研究结果将为抗光老化产品的开发利用提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

(1) 样品: 组方提取物 A 由无限极(中国)有限公司提供(基于保密要求, 暂不能公布具体成分); 维生素 C 片白色固体片剂, 每片含维生素 C 100 mg, 100 片/瓶, 广东华南药业集团有限公司生产。

(2) 实验动物: 60 只雌性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 188.0~238.6 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 实验动物质量合格证明编号: 44007200009354;

(3) 实验环境及饲料: 动物饲养在广东省医学实验动物中心 SPF 级动物房, 实验动物使用许可证号: SYXK(粤)2013-0002。动物饲养条件: 5 只/大箱, 群养, 饲养温度与湿度: 20~26 °C, 40~70%, 采用 10h: 14h 昼夜间断照明; 饲养室条件始终保持稳定, 以保证试验结果的可靠性。自由进食饮水, 全价颗粒饲料和饮用水均由广东省医学实验动物中心提供。

(4) 试剂及药品: MMP-1(一抗, 货号 sc-30069, Santa Cruz 公司, 批号 G2511)、MMP-2(一抗, 货号 ab110186, Abcam 公司, 批号 GR52940-12)、MMP-9(一抗, 货号 ab7299, Abcam 公司, 批号 GR168630-1)、

MHC Class II RT1Bu/L(一抗, 货号 MCA45GA, 英国 AbD Serotec 公司, 批号 0807); 免疫组化试剂盒(博士德生物技术有限公司); DAB 显色试剂盒(博士德生物技术有限公司); PBS 缓冲液(pH 7.2~7.4, 博士德生物技术有限公司); 0.01 M 枸橼酸钠缓冲溶液(pH 6.0, 博士德生物技术有限公司); 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水溶液(现配现用); Trizol (Invitrogen(9109)); 氯仿、异丙醇、无水乙醇(广州中南化工有限公司); 石蜡、二甲苯、酒精、丽春红、苏木素、中性树胶(上海三厂, 批号 H1313007)、维多利亚蓝(Aladdin chemistry, 批号 1112067); 纯净水, 广东省医学实验动物中心自制。

### 1.2 仪器与设备

全自动生化仪: 日本株式会社日立高新技术公司; 紫外光疗仪: 天津市合普科技有限公司; BS224S 型万分之一天平, 精度: 0.0001 g, 德国 Sartorius 公司; ACS 电子天平, 精度: 0.1 g, 上海友声衡器有限公司; BS3000A 型电子天平, 精度: 0.1 g, 上海友声衡器有限公司。普通 PCR 仪(BIO-RAD C1000 Thermal cycler), 荧光定量仪(ABI 7300), 制冰机(Scotsman(思科特曼)AF 100), 低温离心机(Labogene Scanspeed 1730R), 微型振荡器(海门市麒麟医用仪器厂 QL-901), CU420 型电热恒温水箱(上海一恒科技有限公司), 微量有机分析专用超纯水机(颐洋企业发展有限公司), MC-1180 显微镜(广州粤显光学仪器有限责任公司), TS-8 型转移脱色摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 日本奥林巴斯 BX41 显微镜, HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统(武汉千屏影像技术有限责任公司)。轮转切片机(德国 LEICA 公司 RM 2135), 生物组织全自动脱水机(湖北孝感医用仪器有限公司 TS-12C), 生物组织包埋机及冷冻机(湖北孝感医用仪器有限公司 BM-VII), 摊片烤片机(湖北孝感医用仪器有限公司 CS-VI), 生物组织全自动染色机(湖北孝感医用仪器有限公司 RS-18), 正置光显微镜(Olympus BX41), 病理图像分析系统(Image-Pro Express 5.1.1.14)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 剂量设置与分组

参考《保健食品检验与评价技术规范》2003 年版进行剂量设计<sup>[9]</sup>, 采用人给予受试提取物 A 推荐剂量 1.67 mL/(kg·d)的 5 倍、10 倍和 20 倍分别作为大鼠给予受试提取物 A 的低剂量 8.35 mL/(kg·d)、中剂量 16.7 mL/(kg·d)和高剂量 33.4 mL/(kg·d); 采用人给予维生素 C 的推荐剂量 10 mg/(kg·d)的 5 倍作为大鼠给予维

生素 C 的剂量 50 mg/(kg·d); 大鼠每次灌胃按照 20 mL/kg BW 给予, 每天上、下午分别灌胃 1 次, 即大鼠灌胃量为 40 mL/(kg·d)。

表 1 按体重换算给药剂量

Table 1 Dose conversion according to weight

组别	相当于成人倍数	大鼠剂量/[mL/(kg·d)]
提取物 A	低剂量	5
	中剂量	10
	高剂量	20
维生素 C 组	5	50

分组: 将检疫合格的 60 只大鼠按体重随机分为空白对照组、模型组、维生素 C 组、受试提取物 A 低剂量组、中剂量组和高剂量组, 10 只/组, 共 6 组。

### 1.3.2 供试品与对照品配制方法

#### 1.3.2.1 维生素 C 片

取 6 片 (625 mg) 研磨成粉末后加纯净水定容至 500 mL, 得到浓度为 1.25 mg/mL。

#### 1.3.2.2 3% 戊巴比妥钠

准确量取 3 g 戊巴比妥钠固体, 用生理盐水定容至 100 mL, 混匀, 得到浓度为 3% 的生理盐水溶液。密封室温保存。

### 1.3.3 造模方法

除空白对照组外, 其余各组均予以紫外线照射模拟皮肤光老化损伤。每次照射前, 在大鼠背部 5 cm×5 cm 区域内剃毛, 使皮肤充分暴露, 将大鼠放在紫外光疗仪 (UVA+UVB) 灯具正下方的 30 cm 处照射, 模拟日光中 UVA 和 UVB 的能量比例, 每周照射 2 次, 连续照射 4 周, 每次照射的时间分别是 30 min、40 min、50 min、60 min、70 min、80 min 和 80 min, 累计共 490 min, 造模结束时, UVA 累计辐射量为 123.48 J/cm<sup>2</sup>, UVB 累计辐射量为 4.998 J/cm<sup>2</sup>。

### 1.3.4 干预方法

- (1) 空白对照组不进行任何处理;
- (2) 模型组灌胃同体积溶媒, 每周照射紫外线 2 次;
- (3) 维生素 C 组、受试提取物 A 不同剂量组灌胃相应受试物, 2 次/天, 连续 30 d, 期间每周照射紫外线 2 次;

### 1.3.5 检测指标

#### 1.3.5.1 观察

从实验开始至实验结束每天观察动物的一般临床表现一次。

#### 1.3.5.2 病理形态观察

取照射部位皮肤用 10% 中性甲醛固定, 进行常规脱水、包埋、切片, 用 HE 染色、Masson 染色和

VictoriaBlue 染色<sup>[10]</sup>, 光镜观察并照相, 观察各组之间照射部位皮肤病理学形态差异, 计算成纤维细胞数目、测量真皮浅层厚度的变化、观察胶原纤维与弹性纤维密度的变化。

#### 1.3.5.3 免疫组化检测<sup>[11]</sup>

免疫组化检测照射部位皮肤基质金属蛋白酶 1 (MMP-1)、MMP-2、MMP-9 和 MHC Class II RT1Bu/L 的阳性率 (阳性染色的面积占视野总面积的百分比)。

#### 1.3.5.4 时荧光定量 PCR 检测<sup>[12]</sup>

实时荧光定量 PCR 检测照射皮肤组织中 I 型胶原、III 型胶原、结缔组织生长因子 (CTGF)、转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 基因表达情况。

### 1.3.6 数据分析

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析; 计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以  $\alpha=0.05$  为检验水平。采用重复测量资料方差分析方法对重复检测的数据进行统计分析, 两两比较采用 LSD 检验方法; 采用单因素方差分析方法对单次检测的数据进行统计分析, 两两比较采用 LSD 检验方法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 一般观察

试验期间, 除空白对照组外, 其他组动物在造模期间照射部位皮肤出现不同程度的皮损, 如红疹、溃烂、结痂等。

### 2.2 荧光定量 PCR 检测

由表 2 实验结果可得, 与空白对照组相比, 各组大鼠皮肤的 I 型胶原蛋白表达没有统计学差异 ( $p>0.05$ ); 与模型组相比, 维生素 C 组、提取物 A 高剂量组可以降低照射皮肤组织中 I 型胶原蛋白的表达 ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ )。维生素 C 组、提取物 A 低、中、高剂量组与空白对照组相比, 可以显著提高皮肤组织中 III 型胶原的表达 ( $p<0.01$ ); 与模型组相比, 维生素 C 组与提取物 A 低、中、高剂量组可以显著提高皮肤组织中 III 型胶原的表达 ( $p<0.01$ )。与空白对照组相比, 各组大鼠皮肤 CTGF 表达没有统计学差异 ( $p>0.05$ ); 与模型组相比, 各组大鼠皮肤 CTGF 表达没有统计学差异 ( $p>0.05$ )。与空白对照组相比, 模型组皮肤 TGF- $\beta_1$  的表达显著增加 ( $p<0.01$ ), 提取物 A 低、中、高剂量组 TGF- $\beta_1$  的表达显著降低 ( $p<0.01$ ); 与模型组相比, 维生素 C 组与提取物 A 低、中、高剂量组 TGF- $\beta_1$  的表达显著降低 ( $p<0.01$ )。

因此荧光定量 PCR 检测表明, 提取物 A 低、中、

高剂量干预可以增加照射部位皮肤中 III 型胶原的表达、降低 TGF-β<sub>1</sub> 表达。

表 2 荧光定量 PCR 检测照射皮肤中 I 型胶原、III 型胶原、CTGF 和 TGF-β<sub>1</sub> 基因相对表达的 2<sup>-ΔΔCt</sup> 值 (x̄±s, ♀, n=10)

Table 2 2<sup>-ΔΔCt</sup> values of collagen type I, collagen type III, CTGF, and TGF-β<sub>1</sub> gene expression levels in irradiated skin as detected by fluorescence quantitative PCR

组别	剂量/[mg/(kg·d)]	I 型胶原	III 型胶原	CTGF	TGF-β <sub>1</sub>
空白对照组	-	0.73±0.42	1.58±1.56	1.11±0.51	0.87±0.67 <sup>ΔΔ</sup>
模型组	-	1.22±0.68	1.49±0.90	1.36±1.03	1.42±0.86 <sup>**</sup>
维生素 C 组	50	0.56±0.33 <sup>Δ</sup>	1.95±1.55 <sup>**ΔΔ</sup>	0.81±0.59	0.68±0.36 <sup>ΔΔ</sup>
提取物 A 低剂量组	8.35	1.42±0.88	71.65±40.16 <sup>**ΔΔ</sup>	1.06±0.74	0.27±0.31 <sup>**ΔΔ</sup>
提取物 A 中剂量组	16.7	1.25±0.53	74.66±34.08 <sup>**ΔΔ</sup>	1.78±1.32	0.30±0.22 <sup>**ΔΔ</sup>
提取物 A 高剂量组	33.4	0.33±0.41 <sup>ΔΔ</sup>	67.11±19.49 <sup>**ΔΔ</sup>	0.82±0.47	0.05±0.05 <sup>**ΔΔ</sup>

注: 与空白对照组比较, “\*”*p*<0.05, “\*\*”*p*<0.01; 与模型组比较, “Δ”*p*<0.05, “ΔΔ”*p*<0.01。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法对荧光定量 PCR 结果进行分析, 2<sup>-ΔΔCt</sup> 值可以表示基因相对表达的量。

### 2.3 组织病理学和免疫组化检测结果

表 3 表皮、真皮厚度测定及成纤维细胞数目计算

Table 3 Thickness of the epidermis and dermis, and the calculated fibroblast number

组别	n	表皮厚度/mm	真皮厚度/mm	成纤维细胞数目
空白对照组	10	0.020±0.005	0.815±0.063	23±3
模型组	10	0.105±0.039 <sup>**</sup>	1.038±0.219	64±6 <sup>**</sup>
维生素 C 组	10	0.063±0.017	0.818±0.092	47±12 <sup>#</sup>
提取物 A 低剂量组	10	0.068±0.018	0.874±0.090	55±12
提取物 A 中剂量组	10	0.067±0.019	0.860±0.082	54±11
提取物 A 高剂量组	10	0.067±0.017	0.875±0.121	47±13 <sup>#</sup>

注: \*\*与空白对照组比较, *p*<0.01, #与模型组比较, *p*<0.05, ##与模型组比较, *p*<0.01。

空白对照组皮肤表皮厚薄均匀, 真皮层纤维排列整齐, 皮脂腺未见明显增生; 模型组紫外照射部位皮肤表面局部坏死结痂, 表皮细胞明显增生, 表皮厚度明显增厚, 厚薄不均, 真皮层血管扩张、炎细胞浸润、成纤维细胞增生, 真皮层胶原纤维排列较乱, 弹力纤维变性、局灶性蓄积、增粗、排列紊乱, 皮脂腺明显增生, 毛囊明显增大, 毛发增粗, 模型组皮肤表皮厚度、真皮层成纤维细胞数较空白对照组显著增加。

维生素 C 组、提取物 A 低、中、高剂量组皮肤真皮间质血管扩张、炎细胞浸润、成纤维细胞增生较模型组减轻, 真皮弹力纤维变性、局灶性蓄积较模型组减轻。表皮厚度较模型组降低, 但未见统计学差异。

### 2.4 免疫组化

#### 2.4.1 免疫组化测定皮肤组织 MMP-1 的表达

研究表明<sup>[13-16]</sup>, 细胞-基质间相互作用, 尤其是与 I 型胶原相接触在激发角质形成细胞 MMP-1 合成中起关键性作用。当体内 MMP-1 过度表达时, 会降解 ECM 的胶原蛋白, 真皮层结构由于胶原蛋白的分解, 而遭到破坏。

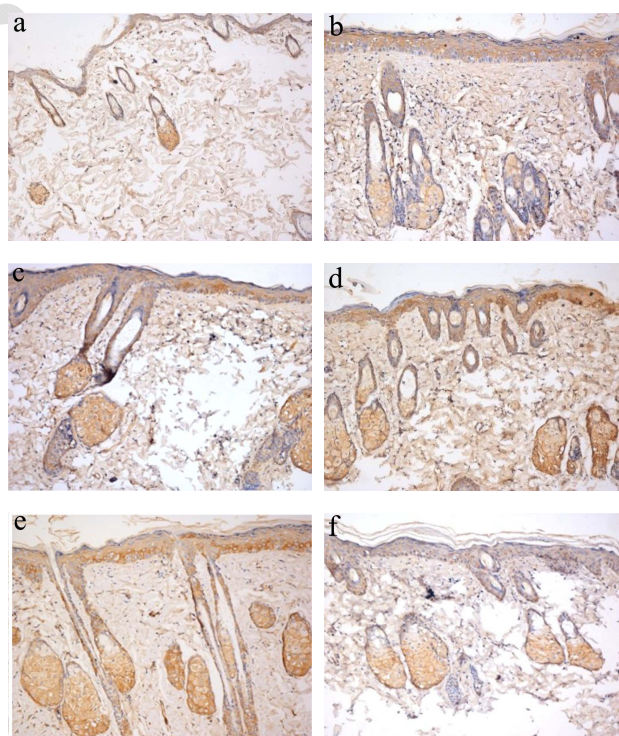


图 1 MMP-1 在皮肤中的表达情况 (×200)

Figure.1 Expression of MMP-1 in the skin (×200)



注: a、b、c、d、e 和 f 分别为空白对照组、模型组、维生素 C 组、提取物 A 低剂量组、提取物 A 中剂量组和提取物 A 高剂量组。

免疫组化结果显示, MMP-1 在皮肤表皮、皮脂腺、平滑肌细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞中阳性表达, 部位为细胞质 (见图 1)。

采用 HMIAS-2000 分析 MMP-1 的阳性率 (阳性染色的面积占视野总面积的百分比), 组间采用 SPSS 21.0 秩和检验, 表 4 结果显示, 模型组皮肤组织内 MMP-1 表达较空白对照组显著增多 ( $p < 0.01$ ), 提取物 A 高剂量组皮肤组织内 MMP-1 表达较模型组明显降低 ( $p < 0.05$ )。

表 4 各组皮肤组织 MMP-1 表达的阳性率

Table 4 Positive rate of MMP-1 expression in skin tissue of all groups

组别	n	阳性率/%
空白对照组	10	3.9±1.1
模型组	10	16.1±4.9 **
维生素C组	10	11.8±4.4
提取物A低剂量组	10	15.8±5.9
提取物A中剂量组	10	14.2±5.6
提取物A高剂量组	10	10.7±7.2#

注: \*\*与空白对照组比较,  $p < 0.01$ , #与模型组比较,  $p < 0.05$ 。

### 2.4.2 免疫组化测定皮肤组织 MMP-2 的表达

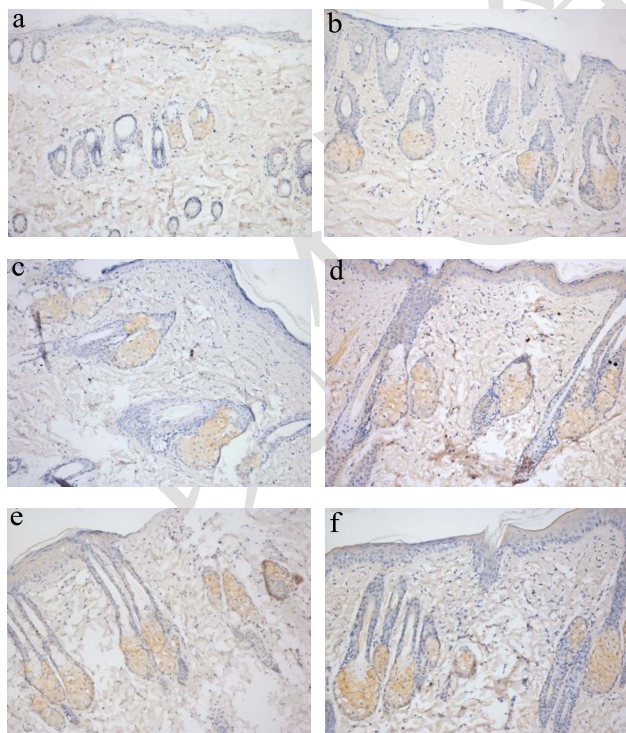


图 2 MMP-2 在皮脂腺细胞中的表达情况 (×200)

Figure.2 Expression of MMP-2 in the skin (×200)

注: a、b、c、d、e 和 f 分别为空白对照组、模型组、维

生素 C 组、提取物 A 低剂量组、提取物 A 中剂量组和提取物 A 高剂量组。

MMP2 是一族依赖锌离子而降解各种细胞外基质的蛋白酶, 亦称 IV 型胶原酶或称明胶酶 A, 其主要功能为降解 IV 型胶原, 因而它在肿瘤细胞突破基底膜屏障和浸润转移中起重要作用。目前主要用于各种恶性肿瘤 (如乳腺癌、胃肠道癌、卵巢癌、膀胱癌等) 中的基底膜检测与转移浸润的研究。

免疫组化结果显示, MMP-2 在皮脂腺细胞、平滑肌细胞及皮下肌层横纹肌细胞中阳性表达, 部位为细胞质 (图 2)。采用 HMIAS-2000 分析 MMP-2 的阳性率 (阳性染色的面积占视野总面积的百分比), 组间采用 SPSS 21.0 秩和检验, 表 5 结果显示, 模型组皮肤组织内 MMP-2 表达较空白对照组显著增多 ( $p < 0.01$ )。提取物 A 各剂量组皮肤组织的 MMP-2 表达与模型组无显著性差异。

表 5 各组皮肤组织 MMP-2 表达的阳性率

Table 5 Positive rate of MMP-2 expression in skin tissue of all groups

组别	n	阳性率/%
空白对照组	10	1.2±0.4
模型组	10	3.6±1.7**
维生素C组	10	2.9±0.9
提取物A低剂量组	10	3.5±1.5
提取物A中剂量组	10	2.9±1.0
提取物A高剂量组	10	2.5±1.2

注: \*\*与空白对照组比较,  $p < 0.01$ , #与模型组比较,  $p < 0.05$ 。

### 2.4.3 免疫组化测定皮肤组织 MMP-9 的表达

MMP-9 亦称 IV 型胶原酶或明胶酶 B, 其主要功能为降解 IV 型胶原。因而它在肿瘤细胞突破基底膜屏障和浸润转移中起重要作用。目前主要用于各种恶性肿瘤 (如乳腺癌、胃肠道癌、卵巢癌、膀胱癌等) 中的基底膜检测与转移浸润的研究。细胞外基质在维持正常组织结构与功能以及细胞生长和分化过程中起重要作用。细胞外基质动态平衡的失调与肿瘤细胞侵袭、转移和复发密切相关, 基质金属蛋白酶 (MMP-9) 是细胞外基质的降解酶, 可降解 IV、V、IX、XI 型胶原, 在肿瘤的浸润、转移过程中起重要作用, 近年为肿瘤研究的热点。

免疫组化结果显示, MMP-9 在皮脂腺细胞中阳性表达, 部位为细胞质。采用 HMIAS-2000 分析 MMP-9 的阳性率 (阳性染色的面积占视野总面积的百分比), 组间采用 SPSS 21.0 秩和检验, 表 6 结果显示, 模型组皮肤组织内 MMP-9 表达较空白对照组显著增多 ( $p < 0.01$ )。提取物 A 各剂量组和维生素 C 组大鼠皮

肤的 MMP-9 表达均较空白组显著增多, 但各组间无显著性差异。

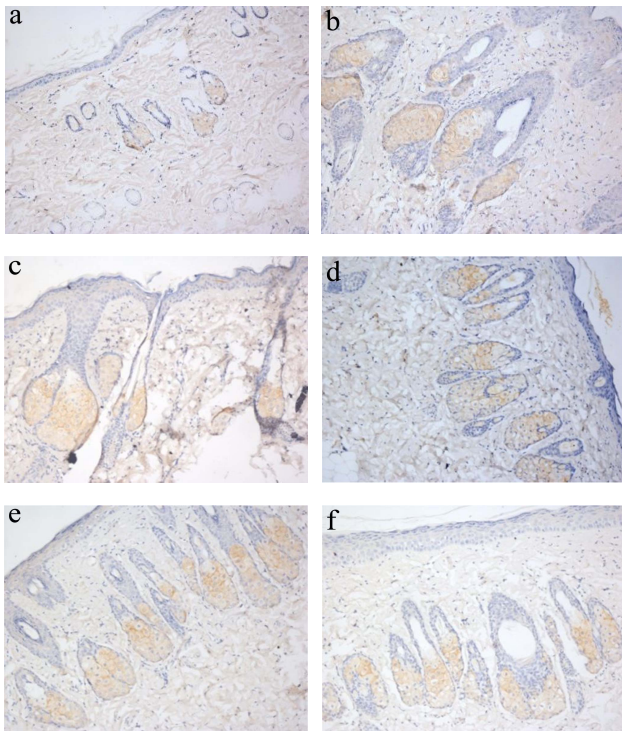


图3 MMP-9 在皮脂腺细胞中的表达情况 (×200)

Figure.3 Expression of MMP-9 in the skin (×200)

注: a、b、c、d、e 和 f 分别为空白对照组、模型组、维生素 C 组、提取物 A 低剂量组、提取物 A 中剂量组和提取物 A 高剂量组。

表 6 各组皮肤组织 MMP-9 表达的阳性率

Table 6 Positive rate of MMP-9 expression in skin tissue of all groups

组别	n	阳性率/%
空白对照组	10	0.9±0.3
模型组	10	3.0±1.2**
维生素C组	10	2.5±0.6
提取物A低剂量组	10	2.2±0.7
提取物A中剂量组	10	2.4±1.3
提取物A高剂量组	10	2.7±0.9

注: \*\*与空白对照组比较,  $p < 0.01$ , #与模型组比较,  $p < 0.05$ 。

#### 2.4.4 免疫组化测定皮肤组织 MHC Class II RT1B 的表达

免疫组化结果显示, MHC Class II RT1B 在皮脂腺细胞中阳性表达, 部位为细胞质。采用 HMIAS-2000 分析 MHC Class II RT1B 的阳性率 (阳性染色的面积占视野总面积的百分比), 组间采用 SPSS 21.0 秩和检验, 表 7 结果显示, 模型组皮肤组织内 MHC Class II RT1B 表达较空白对照组显著增多 ( $p < 0.01$ )。提取物

A 各剂量组和维生素 C 组大鼠皮肤的 MHC Class II RT1B 表达均较空白组显著增多, 但各组间无显著性差异。

表 7 各组皮肤组织 MHC Class II RT1B 表达的阳性率

Table 7 Positive rate of MHC Class II RT1B expression in skin tissue of all groups

组别	n	阳性率/%
空白对照组	10	0.6±0.4
模型组	10	3.0±0.7**
维生素C组	10	2.7±0.8
提取物A低剂量组	10	2.9±0.8
提取物A中剂量组	10	2.5±1.0
提取物A高剂量组	10	2.1±0.7

注: \*\*与空白对照组比较,  $p < 0.01$ , #与模型组比较,  $p < 0.05$ 。

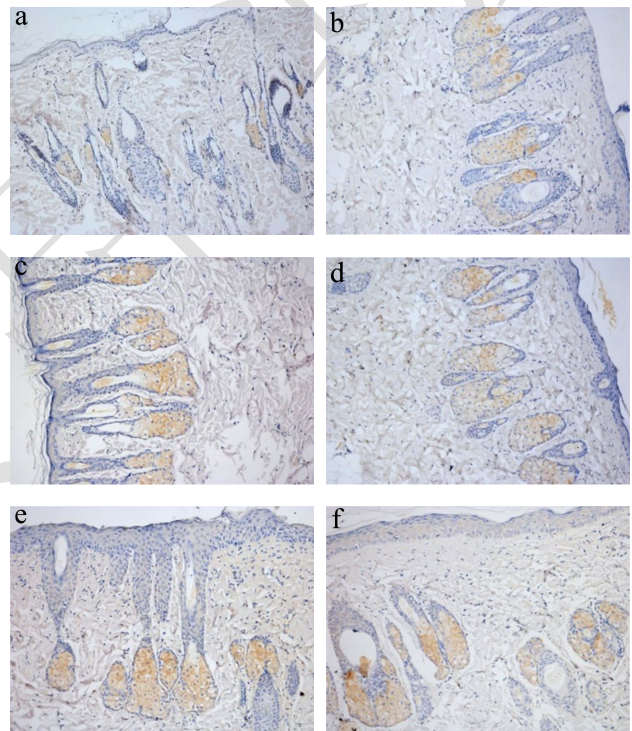


图4 MHC Class II RT1B 在皮脂腺细胞中的表达情况 (×200)

Figure.4 Expression of MHC Class II RT1B in the skin (×200)

注: a、b、c、d、e 和 f 分别为空白对照组、模型组、维生素 C 组、提取物 A 低剂量组、提取物 A 中剂量组和提取物 A 高剂量组。

#### 2.5 讨论

模型组皮肤组织内 MMP-1、MMP-2、MMP-9、Ia 抗原表达较空白对照组显著增多 ( $p < 0.01$ ); 提取物 A 高剂量组皮肤组织内 MMP-1 表达较模型组明显降低 ( $p < 0.05$ )。因此, 光老化大鼠模型的建立是成功的。提取物 A 低、中、高剂量干预可以减轻照射部位皮肤真皮间质血管扩张、炎细胞浸润、成纤维细胞增生、



真皮弹力纤维变性和局灶性蓄积等症状,改善表皮、真皮的超微结构,降低皮肤中 MMP-1、MMP-2、MMP-9 和 Ia 抗原 (MHC Class II RT1B) 的表达。但是关于光老化过程中基质金属蛋白酶通路的机制研究,将在以后工作中进行深入探讨。

### 3 结论

在本实验条件下,成功建立了光老化大鼠模型。组方提取物 A 对光老化大鼠表皮和真皮损伤程度有一定的改善作用,其作用机制可能与降低皮肤中 TGF- $\beta$ 1、MMP-1、MMP-2、MMP-9 和 Ia 抗原表达,提高皮肤 III 型胶原蛋白水平有关。

### 参考文献

- [1] 冯信忠.皮肤老化与光老化[J].中华医学美容美容杂志,2001,3:52-54  
FENG Xing-zhong. Skin aging and photoaging [J]. Chinese Journal of Medical Aesthetics and Cosmetology, 2001, 3: 52-54
- [2] Oh S, Lee S, Choi W, et al. Skin anti-photoaging properties of ginsenoside Rh2 epimers in UV-B-irradiated human keratinocyte cells [J]. Journal of Biosciences, 2014, 39(4): 673-682
- [3] 杨汝斌,万屏,刘玲.植物提取物抗光老化研究进展[J].中国皮肤性病学杂志,2011,25(4):309-311  
YANG Ru-bin, WAN Ping, LIU Ling. Advance in botanical extract in the prevention of photoaging [J]. The Chinese Journal of Dermato Venereology, 2011, 25(4): 309-311
- [4] 刘玮.皮肤光老化[J].临床皮肤科杂志,2003,32(7):424-426  
LIU Wei. Skin photoaging [J]. Journal of Clinical Dermatology, 2003, 32(7): 424-426
- [5] 王医林,邓丹琪.光老化及其机制[J].医学综述,2009,15(3): 377-379  
WANG Yi-lin, DENG Dan-qi. Photoaging and its mechanism [J]. Medical Recapitulate, 2009, 15(3): 377-379
- [6] Kang S W, Fisher G J, Voorhees J J. Photoaging-pathogenesis, prevention and treatment [J]. Clinics in Geriatric Medicine, 2001, 17(4): 643
- [7] 张学军.现代皮肤病学基础[M].人民卫生出版社,2010  
ZHANG Xue-jun. Modern Dermatology Foundation [M]. People's Medical Publishing House, 2010
- [8] Ohnishi Y, Tajima S, Akiyama M, et al. Expression of elastin-related proteins and matrix metalloproteinases in actinic elastosis of sun-damaged skin [J]. Archives of Dermatological Research, 2000, 292(1): 27-31
- [9] 卫生部关于印发《保健食品检验与评价技术规范》(2003年版)的通知[J].中国食品卫生杂志,2003(3):269  
The ministry of health on the issuance of 《Health Food Inspection and Evaluation of Technical Specifications》 (2003 edition) [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2003, 3: 269
- [10] 王琪海.10600 nm CO<sub>2</sub>点阵激光对豚鼠光老化皮肤治疗作用的初步研究[D].南宁:广西医科大学,2011  
WANG Qi-hai. Treatment effect of 10600 nm CO<sub>2</sub> fractional laser on photoaging of guinea pig skin [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2011
- [11] 杨汝斌,万屏,刘玲,等.SD 大鼠皮肤光老化动物模型建立方法的探索[J].中国皮肤性病学杂志,2011,25(3):199-202  
YANG Ru-bin, WAN Ping, LIU Ling, et al. Construction of photoaging model on sprague-dawley rat [J]. The Chinese Journal of Dermato Venereology, 2011, 25(3): 199-202
- [12] Harbottle A, Birch-Machin M A. Real-time PCR analysis of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion in nonmelanoma skin cancer and its use as a quantitative marker for sunlight exposure in human skin [J]. British Journal of Cancer, 2006, 94(12): 1887-1893
- [13] Shao W, Wang W, Xiong X, et al. Prognostic impact of MMP-2 and MMP-9 expression in pathologic stage IA non-small cell lung cancer [J]. Journal of Surgical Oncology, 2011, 104(7): 841-846
- [14] Habib M A, Salem S A M, Hakim S A, et al. Comparative immunohistochemical assessment of cutaneous cyclooxygenase-2 enzyme expression in chronological aging and photoaging [J]. Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine, 2014, 30(1): 43-50
- [15] Loing E, Bezivin C, Borel M. Cathepsin G as an important mediator of proteolytic ECM degradation in photoaging [C]// Journal of Investigative Dermatology. Albuquerque: Soc. Invest. Dermatol, 2014: S115
- [16] 李春雨.玉屏风散对老化皮肤免疫功能影响的实验研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2009  
LI Chun-Yu. The experimental study of Yupingfengsan impact on aging skin immune function [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2009